

MARBURG

1969

THESIS

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg/Lahn

Direktor: Prof. Dr. med. G.-W. Löhr

Präzipitierende Antikörper gegen Transaminasen aus Humanorganen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Heinz Penther
aus Posen

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. G.-W. Löhr

Präzipitierende Antikörper gegen Transaminasen aus Humanorganen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Heinz Penther
aus Posen

Marburg 1969

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 23.1.1969

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. W. Straub

Referent: Prof. Dr. N. Lang

Correferent: Prof. Dr. G.-W. Löhr

3. Mitteilung und Begründung

4. Ergebnis:

1. Darstellung des Gegenstandes
2. Fragestellung
3. Hypothese
4. Methode
5. Durchführung des Versuchs
6. Auswertung des Versuchs
7. Ergebnisse des Versuchs
8. Diskussion

Meinen lieben Eltern

A Einleitung und Fragestellung

B Methodik

1. Herstellung von Organhomogenaten
2. Antigengewinnung
 - a) Säulentchnik
 - b) Puffer
 - c) Einengung der Extrakte
3. Immunisierung von Kaninchen
4. Serumgewinnung und Lagerung
5. Agargewinnung
6. Nachweis der Antikörper
 - a) OUCHTERLONY-Test
 - b) Immunelektrophorese
 - c) Ringtest nach MANCINI

C Ergebnisse

1. Allgemein
2. Präzipitation in der Immunelektrophorese
3. Enzymspezifität und Kreuzreaktion im OUCHTERLONY-Test
4. Organspezifität im OUCHTERLONY-Test
5. Speziesspezifität
6. Antikörper-Titer und Hemmwirkung

D Diskussion

E Zusammenfassung der Ergebnisse

F Literaturverzeichnis

G Lebenslauf

A Einleitung und Fragestellung

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, die bei Immunisierung von Kaninchen mit Humanorganen erhaltenen Antikörper in ihren präzipitierenden Eigenschaften zu untersuchen. Dabei interessierten die Enzym-, Organ- und Speziespezifität der Antikörper.

Eine große Zahl von Enzymen aus dem Bereich der Pflanzen und Mikroorganismen und aus der Welt der Säuger wurde bisher in geeigneten Versuchstieren auf ihre antigenen bzw antikörperbildenden Wirkungen untersucht.

Nachdem CARNOT und GERARD die Urease aus Sojabohnen als hochtoxisch für Hunde gefunden hatten, gelang es 1931/32 KIRK und SUMNER (16), bei mit kristalliner Urease aus Sojabohnen immunisierten Kaninchen Antikörper zu erzeugen: immunisierte Kaninchen überstanden wiederholte Urease-Gaben.

Mc CARTY (5) erhielt 1949 von Kaninchen hemmendes Antiserum gegen gereinigte Desoxyribonucleinsäure von Streptokokken und beobachtete ferner im Verlauf einer durch Streptokokken verursachten Scharlach-Epidemie bei bestimmten Patienten hohe Titer hemmender Antikörper gegen Streptokokken-DNS.

POLLOCK (34) gelang durch Untersuchungen von Penicillase-Antipenicillase-Systemen die Differenzierung verschiedener Bakterienstämme, während YANOFSKY (42) durch entsprechende Antikörper zwei mutative Komponenten der Tryptophan-Synthetase von E. coli aufdecken konnte.

1926 verwendeten LEIERS und ALBRECHT (22) Malzamyrase zur Immunisierung von Kaninchen, die zwei Arten von Antikörpern bildeten: einen gegen das Fermentprotein, einen gegen Begleitproteine.

GEACHIN und REYNOLDS (9) immunisierten Kaninchen mit gereinigter Schweine-Amylase und erhielten hemmende und präzipitierende Antikörper, die mit Hunde- und Rattenamylase Kreuzreaktionen zeigten.

In der folgenden Zeit wurde eine große Zahl von Enzymen erfolgreich als Antigene verwendet: Tyrosinase (1), Elastase (14), alkal. Phosphatase (3), d-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (18), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (24), Lactat-Dehydrogenase (23, 30), Xanthin-Oxidase (38), Desoxyribonuclease (6) und Transaminasen (20, 21, 25).

Eine Methode zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper Reaktion ist die Präzipitation.

1905 beschrieb BECHHOLD (31) in Gel auftretende Präzipitate von Ziegenserum und Antiziegenserum vom Kaninchen, 1920 NICOLLE-CESARI-DEBAIN das Gleiche für Diphtherietoxin und -antitoxin von Pferden. In der Folgezeit wurden zahlreiche Antigene (32) in Präzipitationsreaktionen geprüft: Kolostrum, Milch, Pneumokokken, Meningokokken, Streptokokken, Dysenterie-, Gasbrand- und Tetanusbazillus.

OUCHTERLONY beschrieb 1948 Diphtherietoxin-Antitoxin-Reaktionen im Gel (31). Mit anschließenden Versuchen trug er Grundlegendes zur Erklärung der Präzipitation zusammen: Erscheinen und Formation des spezifischen Musters eines Präzipitations-Spektrums werden am besten verstanden, wenn man sich den Diffusionsprozess als wandernde, kritische Konzentrationen von Antigen und Antikörper vergegenwärtigt. Präzipitatlinien werden dort geformt, wo solche kritischen Konzentrationen aufeinandertreffen. Die Präzipitatlinie ist eine Barriere, sowohl für das Antigen, als auch für den Antikörper. Wenn nach Ausbildung eines Präzipitats weiterhin die Diffusion eines Stoffes in die Präzipitatzone geschieht, so kann das ursprüngliche Präzipitat zu einer Bandpräzipitation wachsen, die scharf begrenzt ist an der Front des Wachstums, unscharf im Hintergrund.

Präzipitate sind selektiv semipermeabel für die Diffusion einer Komponente, die nicht in einer individuellen

Antigen-Antikörper-Reaktion (d. h. Immunreaktion) eingeschlossen sind. Somit kann das Bild einer beliebigen Antigen-Antikörper-Kombination vorausgesagt werden. OUCHTERLONY zeichnete Reaktionen auf, die eine Aussage über Nichtidentität, Partialidentität und komplette Identität von Antigenen ermöglichen.

B Methodik

1. Herstellung von Organhomogenaten

Es wurden Humanorgane -Herz und Leber- aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg von maximal 24 Stunden vorher Verstorbenen verwandt.

Die Organe von Ratten, vom Schwein und vom Rind waren lebensfrisch.

Nach Säuberung von Blut und weitgehender Entfernung von Fettgewebe erfolgte das Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax-Messer-Homogenisator. Dabei wurden zu 4 g Gewebe 20 ml aqua bidest. von 17° C zugesetzt und im Eiswasserbad 4mal eine halbe Minute lang bei Stufe 7 homogenisiert. Die Homogenate von Herz und Leber wurden 20 Minuten lang bei 15 000 U/Min. zentrifugiert, die Überstände in Dialyseschläuche gefüllt und 12 Stunden lang in Phosphatpuffer vom pH 7,4 dialysiert.

2. Gewinnung der zur Immunisierung verwendeten Antigene durch Säulenchromatographie

Aus den Dialysaten wurden die zur Immunisierung verwendeten Transaminasen: mitochondrale Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (M-GOT) und cytoplasmatische Glutamat-Oxalatacetate-Transaminase (C-GOT) von Herz oder Leber durch Säulenchromatographie gewonnen.

a) Herstellung von Medium und Säulen

Als Medium wurde der Anionenaustauscher Sephadex DEAE - A₅₀ verwendet. Der in Salzform gelieferte Austauscher wurde zum Quellen in ein Gefäß mit reichlich Wasser (mind. 15 ml H₂O/g Trockengew.)

verbracht; kleine Partikel wurden durch Dekantieren entfernt. Das Gel wurde im Faltentrichter zuerst mit 0,5 nHCL und dann mit 0,5 nNaOH durchgespült, anschließend mit H_2O gewaschen und ungefähr auf den pH-Wert des im nachfolgenden Versuch verwendeten Puffers eingestellt.

Wir füllten Glassäulen von 5 cm Durchmesser und 50 cm Höhe, die am unteren Ende durch einen Hahn verschlossen, am oberen Ende offen waren, mit dem Austauscher-Gel bis zu $3/4$ ihres Volumens. Eine Lage Glaswolle verhinderte das Ausfließen. Nach gutem Äquilibrieren des Mediums mit dem für den nächsten Versuch verwendeten 0,008 molaren Phosphatpuffer von pH 7,0 beschickten wir je eine Säule von oben her mit dialysiertem Human-Herz bzw Human-Leber-Homogenat im Verhältnis von Gel : Homogenat wie 4 : 1. Bei geschlossenem Hahn wurde das vollständige Einsickern des Homogenats in das Medium abgewartet.

Die so präparierten Säulen montierten wir auf einen selbsttätigen Reagenzglas-Sammler (Firma Gilson Medical Electronics, Middleton), der sich in einem Kühlraum von $+ 4^{\circ} C$ Temp. befand.

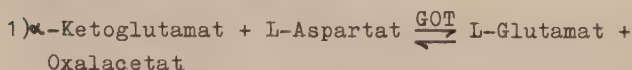
b) Elution der M-GOT

Zur Elution der M-GOT des Herz- bzw Leber-Homogenats tropfte ein 0,008 molarer Phosphatpuffer I vom pH 7,0 auf den Säuleninhalt, durchspülte diesen und wurde, die M-GOT enthaltend, fraktioniert in durchschnittlicher Menge von 10 ml je Reagenzglas aufgefangen.

Gleichzeitig vorgenommene Aktivitätsbestimmungen für M-GOT im Photometer Eppendorf orientierten über Beginn, Höhepunkt und Ende der M-GOT-Elution, wobei erfahrungsgemäß die hauptsächliche Enzymmenge in den ersten 15 Reagenzgläsern enthalten war.

c) Aktivitätsbestimmung

Der Aktivitätsmessung für M-GOT lagen die Formeln folgenden Reaktionsablaufs zugrunde:



In einer Kuvette wurden 0,03 ml DPNH, 0,01 ml KGS, 0,02 ml MDH und M-GOT im Trilonpuffer vom pH 7,5 fünf Minuten inkubiert und nach Zugabe von 0,05 ml Asparaginsäure im Eppendorf-Photometer die Extinktionsänderung/Zeiteinheit bei einer Wellenlänge von 366 m μ bestimmt.

$$\text{Nach der Formel: } \frac{\text{mU/ml}}{1800} = \frac{1}{\frac{0,1 \times \text{sec}}{0,1 - \Delta E \ 0,1}}$$

errechnete sich die M-GOT-Aktivität mit

$$\text{mU/ml} = \frac{1800}{\frac{0,1 \times \text{sec}}{0,1 - \Delta E \ 0,1}}$$

Die Aktivität war unterschiedlich, sie bewegte sich zwischen 3 000 mU/ml Eluat und 18 000 mU/ml Eluat.

d) C-GOT - Gewinnung

Nach Elution der M-GOT wurden die Säulen zur Gewinnung der C-GOT mit Phosphatpuffern II - VII von steigender Molarität und konstantem pH von 6,0 durchgespült (s. Tabelle 1).

Tab. 1

Verwendete Phosphat-Puffer

	I	II	III	IV	V	VI	VII
pH	7	6	6	6	6	6	6
Phosphat Mol	0,008	0,01	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05
NaCl Mol					0,02	0,05	0,1
Stammlsg ml	4	5	10	25	25	50	50
0,2M NaCl ml					10	50	100
H ₂ O ml	96	95	90	75	65	100	50

In den meisten Fällen wurde die C-GOT beim Phosphatpuffer VI gewonnen und war dabei von so geringer Konzentration je Röhrchen, daß durchschnittlich 40 - 60 Reagenzgläser die Gesamtmenge enthielten.

Aktivitätsbestimmungen differierten von denen für M-GOT in praxi lediglich durch unterschiedliche Substratoptima.

e) Einengung und Lagerung der Enzyme

M-GOT und besonders C-GOT mußten auf ein Drittel bis ein Fünftel ihres Ausgangsvolumens eingengt werden, um genügend hohe Enzym-Aktivitäten (mU/ml Eluat) zu erreichen. Anfangs wurden die Enzyme dazu in Dialyseschläuchen in Silica-Gel (Firma Riedel de Häen) gelegt, das zuvor auf 400° C erhitzt und wieder abgekühlt worden war.

Ein schonenderes Verfahren war die Einengung mit Luviskol K 30 (Firma Riedel de Häen). Luviskol engte, wenn es mit wenig Puffer angemengt wurde, sehr gut ein (bei 50 ml in 3 Std. auf 4 ml). Die Einengung geschah in Schläuchen, am besten in hohen Glaszylindern, damit das eingengte Protein

nach unten sinken konnte und somit bei genügend verbleibendem Puffer in Lösung bleiben konnte. Anschließend dialysierten dieselben Schläuche gegen Puffer auf einem Rührwerk, weil Luviskol die Membran passieren kann.

Waren besonders hohe Enzymaktivitäten erforderlich, bewährte sich zur Einengung das Membranfilter-Gerat der Sartorius-Werke, Göttingen, wobei unter Verwendung des Filters LSG 60 bei einem Druck von 8 - 9 kg/cm² unter ständigem Schütteln eingengt wurde.

Die eingengten Enzyme wurden nach Zugabe von 0,01 - 0,02 Natriumnazid im Kühlfach bei + 4° C aufbewahrt.

3) Immunisierung der Kaninchen

Es standen insgesamt 8 gesunde, zu keinem früheren Experiment verwendete Kaninchen (Tier 1 - 8) im Versuch. Vor der Immunisierung wurde allen Tieren Venenblut aus dem Ohr zur Gewinnung von Kontrollseren abgenommen. Dann immunisierten wir die Tiere mit M-GOT bzw C-GOT von Human-Herz bzw Human-Leber (s. Tab. 2)

Tab. 2

Tier	Immunisiert mit:
1 - 2	Human-Herz M-GOT
3 - 4	Human-Leber M-GOT
5 - 6	Human-Herz C-GOT
7 - 8	Human-Leber C-GOT

Wir injizierten unter Zusatz von 0,2 ml Aluminiumhydroxyd-Gel als Adjuvans pro Sitzung 0,4 ml Enzym intraperitoneal in 6-tägigen Abständen über insgesamt 7 Wochen.

Die Enzymaktivität für M-GOT lag zwischen Werten von 9 000 - 18 000 mU/ml Eluat, die für C-GOT zwischen 3 000 - 9 000 mU/ml Eluat.

An Komplikationen wurde bei einem Tier eine temporäre Lähmung der Hinterläufe, bei einem zweiten eine Pyelonephritis beobachtet, Tier 4 kam 6 Wochen nach Erstinjektion aus ungeklärter Ursache ad exitum.

4) Gewinnung und Lagerung der Seren

Zur Serumgewinnung entnahmen wir mehrmals Vollblut aus der Ohrvene, das wir 5 Minuten lang bei 3 000 U/Min. zentrifugierten. Das die Antikörper enthaltende Serum wurde vorsichtig vom Erythrozytensediment getrennt und zur Aufbewahrung nach Zusatz von 0,01 mg Natriumnazid pro ml Serum eingefroren.

Ein erstes Auftreten von Antikörpern wurde 20 Tage nach der Erstinjektion festgestellt; nach maximal 30 Tagen hatten sämtliche Kaninchen Antikörper gebildet.

Dies zeigten Messungen der Enzymaktivitätshemmung (s. Tab. 3), wobei sich ferner ergab, daß der Gehalt an enzymaktivitätshemmenden (präzipitierenden) Antikörpern und der Grad der Enzymhemmung durch die einzelnen Antiseren sehr unterschiedlich war: so schwankten die Werte der Hemmung zwischen 25 % und 94 %.

Tab. 3

Zeitliches Auftreten der Antikörper und Enzymaktivitäts-
hemmung

Tier	Immunisiert mit	Auftreten der Antikörper nach Tagen	Enzymaktivitäts- hemmung (%)
1	Human-Herz	21	46 - 56
2	M-GOT	21	64 - 81
3	Human-Leber	30	48 - 51
4	M-GOT	30	25
5	Human-Herz	20	86 - 87
6	C-GOT	20	86 - 94
7	Human-Leber	22	67 - 78
8	C-GOT	22	57 - 65

5) Agarbereitung

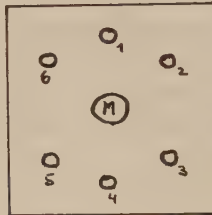
Als Medium der Bindung und Präzipitation von Antigen und Antikörper wurde ein Agar-Gel verwendet. Der Reinagar (Behringwerke, Marburg) wurde mit Michaelispuffer vom pH 8,2 versetzt (1,5 g Agar auf 100 ml Puffer) und im Wasserbad bei 100° C unter gelegentlichem Umrühren verflüssigt. Nach vollständiger Lösung wurde zur Verhinderung bakterieller Zersetzung 0,02 % Natriumacid zugefügt. In angewärmten Zentrifugengläsern wurde der noch flüssige Agar 10 Min. lang bei 5 000 U/Min. zentrifugiert und nach Erkalten im großen, verschlossenen Erlenmeyerkolben aufbewahrt.

6) Nachweis der Antigen-Antikörper-Präzipitate

Die Bindung des Antikörpers an das Antigen wurde durch Präzipitation im Agar nach der Methode von OUCHTERLONY, in der Immunelektrophorese und im Ringtest nach MANCINI nachgewiesen.

a) OUCHTERLONY-Test

Auf quadratische Objektträger (Seitenlänge 4 cm) wurden mit der Pipette 5 ml warmen, dünnflüssigen Agars gleichmäßig aufgetragen und nach Erkalten nach folgendem Schema Löcher von 0,5 cm Durchmesser ausgestanzt:



Diese Anordnung ermöglichte einige Variationen: es konnten gleichzeitig 6 verschiedene Antigene in ihrem Verhalten gegen einen in der Mitte aufgetragenen Antikörper oder im umgekehrten Sinn untersucht werden.

Jedes Loch wurde mit 0,04 - 0,05 ml beschickt und die Objektträger zur Präzipitatbildung und Verhütung des Austrocknens des Agars in die feuchte Kammer verbracht.

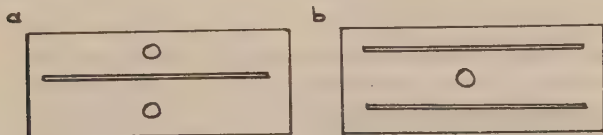
Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Antigen und Antikörper war unterschiedlich, d. h. das Auftreten der Präzipitationslinien erfolgte in ungleichem Abstand vom Tag des Ansatzes. So traten Präzipitate frühestens am 2. Tag, spätestens nach 8 bis 10 Tagen auf.

Nach Auftreten der Linien wurden die Objektträger zum Herauswaschen von Unreinheiten und löslichen, nicht präzipitierten Eiweißes für 2 Tage in physiologischer Kochsalzlösung, unter zweimaligem Erneuern der Lösung, gewässert. Nach Auflegen von Filterpapier auf den Agar erfolgte bei Zimmertemperatur während 12 Std. das Trocknen und anschließend das Färben: dabei wirkte Amidoschwarz (0,5 g pro 100 ml Methanol-Eisessig 9 : 1) auf den getrockneten Agar ein, färbte Präzipitatlinien und die restliche Agarsubstanz in einen gleichmäßigen blauschwarzen Farbton, wurde anschließend mit Methanol-Eisessig 9 : 1 aus dem Agar wieder herausgelöst, so daß sich nur die Präzipitatlinien in blauschwarzem Farbton darstellten.

b) Immunelektrophorese

Bei diesen Versuchen wanderte in Agar verbrachtes Antigen im Gleichstromfeld und diffundierte gegen anschließend aufgetragenes Antiserum.

Auf Objektträger trugen wir 3 ml Agar in gleichmäßiger Schicht auf und versahen sie nach folgendem Schema mit Löchern und Rinnen:



Das Antigen wurde meist in die Löcher, seltener in die Rinnen eingefüllt. Dann wurden die Objektträger in die mit Michaelispuffer pH 8,2 gefüllte Elektrophoresekammer gelegt; während 90 Min. wirkte ein Gleichstrom von maximal 45 Volt auf den Agar ein, höhere Spannung führte zum Verdampfen und Schmelzen des Agars.

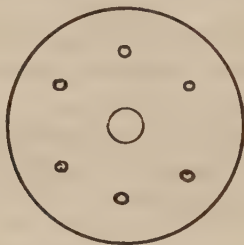
Nach Beendigung der Elektrophorese füllten wir das Antiserum in die Rinnen, und die Objektträger wurden, gleichlaufend den OUCHTERLONY-Tests, zur Präzipitatbildung in die feuchte Kammer gelegt, anschließend getrocknet und gefärbt.

c) MANCINI-Technik

An Hand der MANCINI-Technik sollte der Antikörpertiter der Seren von den verschiedenen Abnahmetagen ermittelt werden.

Dazu wurden 6 ml Agar und 2 ml Antigen getrennt auf 50° C erwärmt, miteinander vermischt und bei 60° C im Trockenschrank in vorgewärmte ebene Petrischalen von 9 cm Durchmesser gegossen.

Nach Erkalten der Platten erfolgte das Ausstanzen der Löcher nach folgendem Schema:



In die Löcher füllten wir je 0,025 ml Antiserum der verschiedenen Abnahmetage, das gegen das im Agar gelöste Antigen diffundierte.

Die nach 24 Std. auftretenden Präzipitationshöfe wurden mit der Skalen-Lupe ausgemessen. Sie zeigten unterschiedliche Durchmesser.

Ein Anfärben der nur schwach ausgeprägten Linien oder eine photographische Darstellung waren nicht möglich. Die Größe des Präzipitationshofes im Vergleich zu dem Prozentsatz der Hemmung im Photometer ist graphisch dargestellt.

C Ergebnisse

- 1) Sieben von insgesamt acht Versuchstieren (Tier vier starb frühzeitig) bildeten Antikörper gegen die ihnen injizierten Transaminasen von Human-Herz und Human-Leber.

Die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper wurde durch Immunpräzipitation im Agar-Medium sichtbar gemacht.

Methodisch kamen die Immunelektrophorese, das Verfahren nach OUCHTERLONY und der Ringtest nach MANCINI zur Anwendung.

- 2) Präzipitation in der Immunelektrophorese

In der Immunelektrophorese wurden die Human-Herz M-GOT bzw C-GOT von den gegen sie gerichteten Antikörpern in einer einzigen Linie präzipitiert (Abb. 1 und 2)*

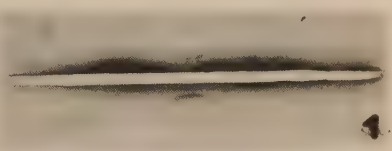
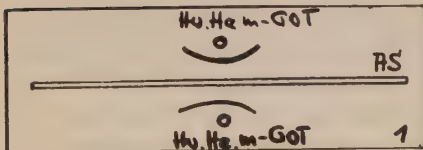


Abb. 1 Präzipitation in der Immunelektrophorese
Löcher: Human-Herz M-GOT, Rinne: Antiserum

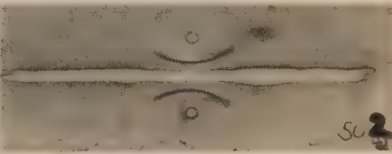
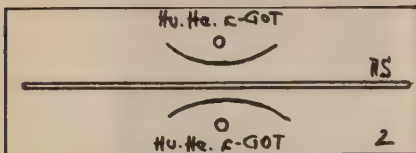


Abb. 2 Präzipitation in der Immunelektrophorese
Löcher: Human-Herz C-GOT, Rinne: Antiserum

* Die folgenden Abbildungen zeigen rechts das Originalphoto, dazu eine Skizze und den Text.

Gleichsinnige Ergebnisse entstanden bei der Präzipitation der Human-Leber M-GOT bzw C-GOT mit ihren entsprechenden Antikörpern (Abb. 3 und 4).

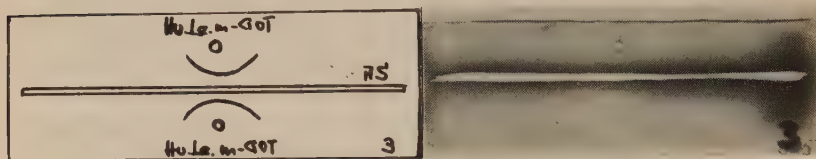


Abb. 3 Präzipitation in der Immunelektrophorese
Löcher: Human-Leber M-GOT, Rinne: Antiserum

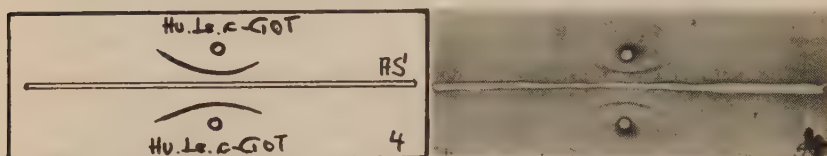


Abb. 4 Präzipitation in der Immunelektrophorese
Löcher: Human-Leber C-GOT, Rinne: Antiserum

- 3) Enzymspezifität im OUCHTERLONY-Test und Kreuzreaktion
Die Präzipitation im OUCHTERLONY zeigte von der in der Immunelektrophorese abweichende Ergebnisse.
So wurde die Human-Herz M-GOT-Fraktion in einem Fall (Antiserum I) in maximal 2 Linien präzipitiert (Abb. 5).

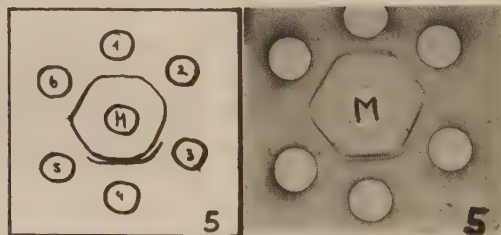


Abb. 5 Präzipitation im OUCHTERLONY-Test
M: Human-Herz M-GOT, 1 - 6: Antiserum I

(Welche der beiden Linien der Enzymlinie entsprach, konnte nicht genau gefunden werden, da eine M-GOT-spezifische Färbemethode nicht zur Verfügung stand).

Vom Antiserum II (AS II) wurde die Human-Herz M-GOT in nur einer einzigen Linie präzipitiert (Abb. 6), deren Identitätsreaktion mit einer der Präzipitationslinien des Antiserum I nicht untersucht wurde.

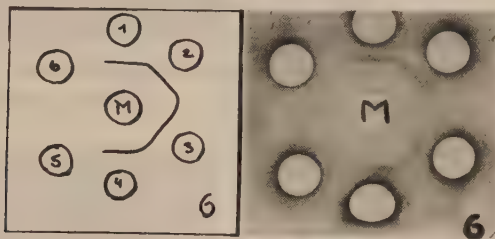


Abb. 6 Präzipitation im OUCHTERLONY-Test
M: Human-Herz M-GOT, 1 - 6: Antiserum II

Human-Leber M-GOT zeigte mit dem Antiserum III zwei Linien (Abb. 7).

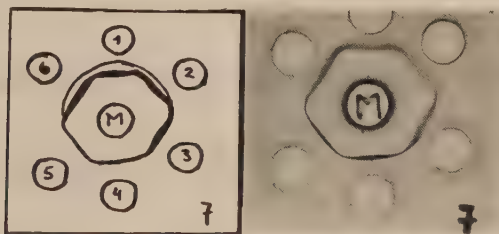


Abb. 7 Präzipitation im OUCHTERLONY-Test
M: Human-Leber M-GOT, 1 - 6: Antiserum III

Sowohl die Herz C-GOT (Abb. 8) als auch die Leber C-GOT (Abb. 9) wurden von dem AS V bzw AS VII in 2 Linien präzipitiert.

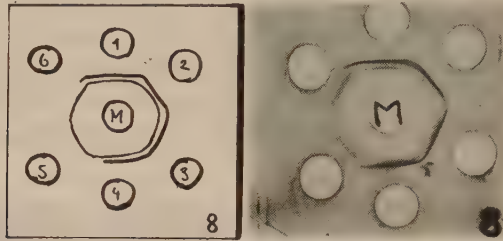


Abb. 8 Präzipitation im OUCHTERLONY-Test
M: Human-Herz C-GOT, 1 - 6: Antiserum V

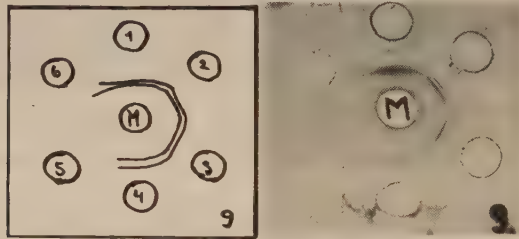


Abb. 9 Präzipitation im OUCHTERLONY-Test
M: Human-Leber C-GOT, 1 - 6: Antiserum VII

Tab. 4

Zahl der Präzipitationslinien der entsprechenden Enzyme.

AS	Herz M-GOT	Leber M-GOT	Herz C-GOT	Leber-C-GOT
I	2			
II	1			
III		2		
IV		Ø		
V			2	
VI			2	
VII				2
VIII				2

In einer Präzipitationsreihe in flachen Petrischalen von 9 cm Durchmesser präzipitierte Anti M-GOT sowohl Herz- als auch Leber M-GOT (Abb. 10 und 11),



Skizze 10

Enzymspezifische Präzipitation

M : Anti-Human Herz M-GOT

1 - 2: Human Herz M-GOT

3 - 4: Human Herz C-GOT

5 - 6: Human Leber M-GOT

7 - 8: Human Leber C-GOT



Skizze 11

Enzymspezifische Präzipitation

M : Anti-Human Leber M-GOT

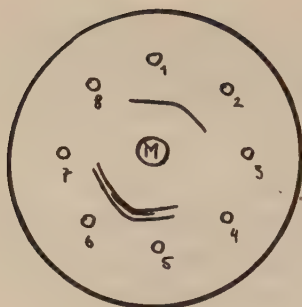
1 - 2: Human Leber M-GOT

3 - 4: Human Leber C-GOT

5 - 6: Human Herz M-GOT

7 - 8: Human Herz C-GOT

nicht aber C-GOT der Organe. Umgekehrt präzipitierte Anti C-GOT sowohl Herz- als auch Leber C-GOT, nicht aber M-GOT von Herz und Leber (Abb. 12 und 13);



Skizze 12

Enzymspezifische Präzipitation

M : Anti-Human Herz C-GOT

1 - 2: Human Herz C-GOT

3 - 4: Human Herz M-GOT

5 - 6: Human Leber C-GOT

7 - 8: Human Leber M-GOT



Skizze 13

Enzymspezifische Präzipitation

M : Anti-Human Leber C-GOT

1 - 2: Human Leber C-GOT

3 - 4: Human Leber M-GOT

5 - 6: Human Herz C-GOT

7 - 8: Human Herz M-GOT

d. h.: die Antikörper waren isoenzymspezifisch, Kreuzreaktionen traten nicht auf (s. Tab. 5).

Tab. 5

Isoenzymspezifische Präzipitation

Antiserum	M-GOT $\leftarrow$ aus Herz oder Leber	C-GOT $\leftarrow$ aus Herz oder Leber
Anti $\leftarrow$ Herz M-GOT Leber M-GOT	+	$\emptyset$
Anti $\leftarrow$ Herz C-GOT Leber C-GOT	$\emptyset$	+

(Eine photographische Darstellung der Präzipitationslinien gelang nicht, da sich diese in der relativ dicken Agarschicht in den Petrischalen nicht anfärben ließen. Der Verlauf der Linien wird in den Skizzen 10 bis 13 wiedergegeben.)

4) Organspezifität im OUCHTERLONY-Test

Eine Organspezifität der Transaminasen-Antikörper war nicht nachweisbar.

Der Herz M-GOT-Antikörper präzipitierte sowohl Herz- als auch Leber M-GOT und die M-GOT beider Organgesamt-extrakte (Abb. 14).

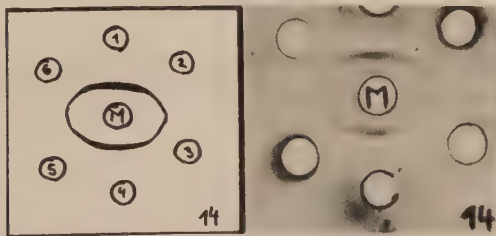


Abb. 14

Organspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Herz M-GOT

1 u. 4: Herzgesamtextrakt

2 u. 5: Lebergesamtextrakt

3 : Leber M-GOT

6 : Herz M-GOT

Der Leber M-GOT-Antikörper verhielt sich völlig gleich (Abb. 15).

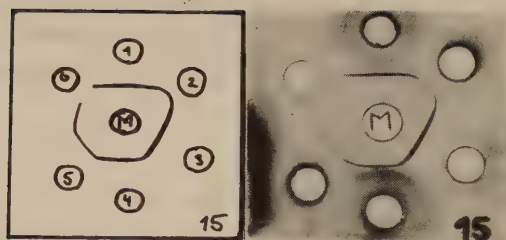


Abb. 15

Organspezifität im OUCHTERLONY-Test

- M : Anti-Leber M-GOT
 1 u. 4: Herzgesamtextrakt
 2 u. 5: Lebergesamtextrakt
 3 : Leber M-GOT
 6 : Herz M-GOT

Prinzipiell gleiche Ergebnisse zeigten Herz C-GOT-Antikörper (Abb. 16) und Leber C-GOT-Antikörper (Abb. 17).

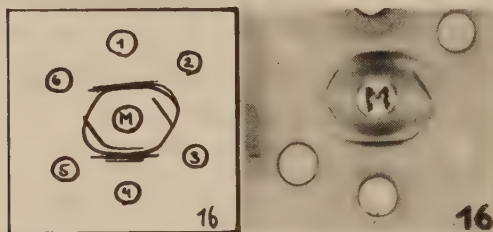


Abb. 16

Organspezifität im OUCHTERLONY-Test

- M : Anti-Herz C-GOT
 1 u. 4: Herzgesamtextrakt
 2 u. 5: Lebergesamtextrakt
 3 : Leber C-GOT
 6 : Herz C-GOT

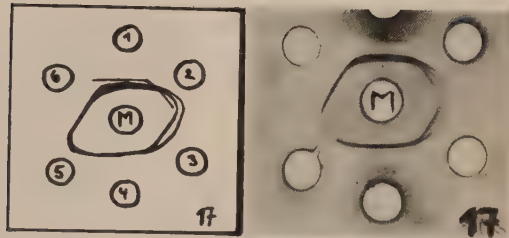


Abb. 17

Organspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Leber C-GOT

1 u. 4: Herzgesamtextrakt

2 u. 5: Lebergesamtextrakt

3 : Leber C-GOT

6 : Herz C-GOT

Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 6

Tab. 6

Organspezifität der Transaminasen-Antikörper

Anti-Seren	Herz M-GOT	Leber M-GOT	Herz C-GOT	Leber C-GOT
Anti-Herz M-GOT	+	+		
Anti-Leber M-GOT	+	+		
Anti-Herz C-GOT			+	+
Anti-Leber C-GOT			+	+

5) Speziespezifität im OUCHTERLONY-Test

Untersucht wurden die korrespondierenden Isoenzyme der Fremdspezies Rind, Schwein und Ratte.

Dabei wurde Rinder-Herz M-GOT nicht präzipitiert (Abb. 18).

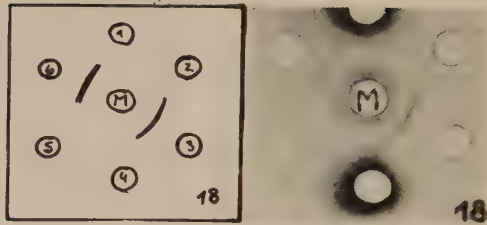


Abb. 18

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Human Herz M-GOT Antikörper

1 u. 4: Rinder-Herz Gesamtextrakt

2 u. 5: Rinder-Herz M-GOT

3 u. 6: Human-Herz M-GOT

ebenso die Rinder-Herz C-GOT (Abb. 19).

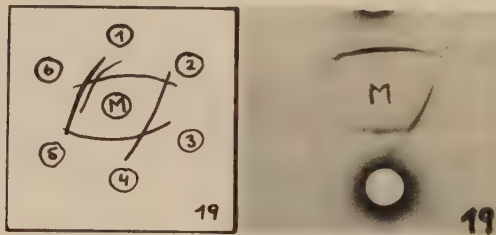


Abb. 19

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Human Herz C-GOT Antikörper

1 u. 4: Rinder-Herz Gesamtextrakt

2 u. 5: Rinder-Herz C-GOT

3 u. 6: Human-Herz C-GOT

Schweine-Herz M-GOT zeigte keine Präzipitation durch Human-Herz M-GOT-Antikörper (Abb. 20), während zwischen Schweine-Herz C-GOT und Human-Herz C-GOT Partialidentität besteht; erkenntlich an den unter Spornbildung ineinanderübergehenden Linien (Abb. 21).

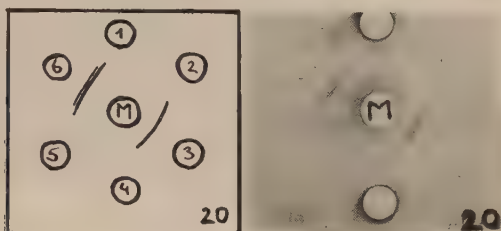


Abb. 20

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Herz M-GOT

1 u. 4: Schweine-Herz Gesamtextrakt

2 u. 5: Schweine-Herz M-GOT

3 u. 6: Human-Herz M-GOT

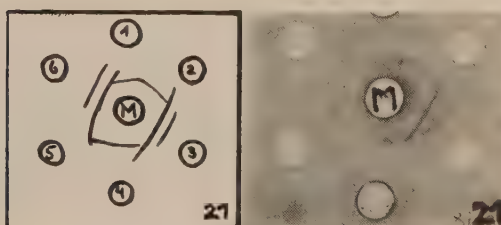


Abb. 21

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Herz C-GOT

1 u. 4: Schweine-Herz Gesamtextrakt

2 u. 5: Schweine-Herz C-GOT

3 u. 6: Human-Herz C-GOT

Sowohl Ratte-Herz M-GOT als auch C-GOT zeigten fragliche Partialidentität mit Human-Herz C-GOT (Abb. 22 und 23).

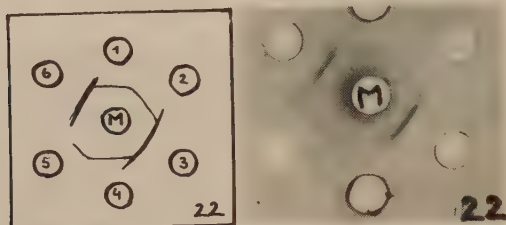


Abb. 22

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Herz M-GOT

1 u. 4: Ratte-Herz Gesamtextrakt

2 u. 5: Ratte-Herz M-GOT

3 u. 6: Human-Herz M-GOT

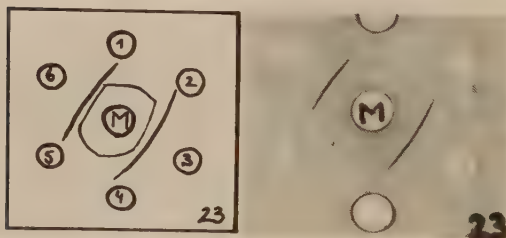


Abb. 23

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Herz C-GOT

1 u. 4: Ratte-Herz Gesamtextrakt

2 u. 5: Ratte-Herz C-GOT

3 u. 6: Human-Herz C-GOT

Davon etwas abweichend waren die Präzipitations- bzw Identitätsverhältnisse der Leber-Transaminasen der Fremdspezies. So war Rinder-Leber M-GOT partialiden- tisch mit Human-Leber M-GOT (Abb. 24),

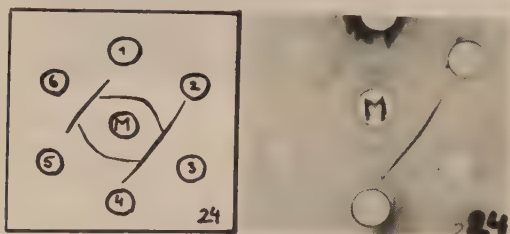


Abb. 24

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Leber M-GOT

1 u. 4: Rinder-Leber Gesamtextrakt

2 u. 5: Rinder-Leber M-GOT

3 u. 6: Human-Leber M-GOT

während die M-GOT von Schwein und Ratte keine Präzipi- tation mit Human-Leber M-GOT zeigte (Abb. 26 und 28).

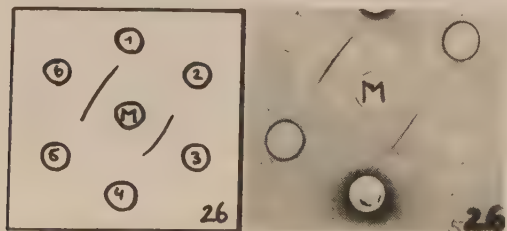


Abb. 26

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Leber M-GOT

1 u. 4: Schweine-Leber Gesamtextrakt

2 u. 5: Schweine-Leber M-GOT

3 u. 6: Human-Leber M-GOT

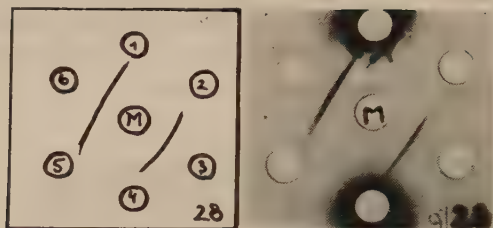


Abb. 28

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Leber M-GOT

1 u. 4: Ratte-Leber Gesamtextrakt

2 u. 5: Ratte-Leber M-GOT

3 u. 6: Human-Leber M-GOT

Die Leber M-GOT von Rind, Schwein und Ratte war serologisch partialidentisch mit der Human-Leber C-GOT (Abb. 25, 27 und 29).

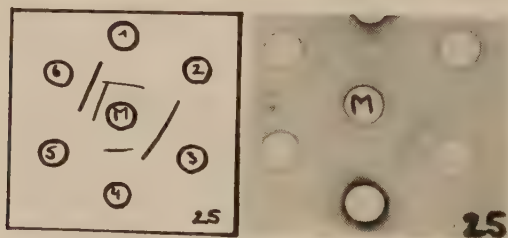


Abb. 25

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Leber C-GOT

1 u. 4: Rinder-Leber Gesamtextrakt

2 u. 5: Rinder-Leber C-GOT

3 u. 6: Human-Leber C-GOT

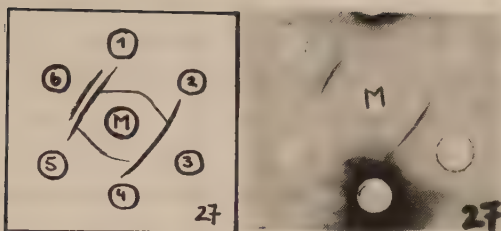


Abb. 27

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Leber C-GOT

1 u. 4: Schweine-Leber Gesamtextrakt

2 u. 5: Schweine-Leber C-GOT

3 u. 6: Human-Leber C-GOT

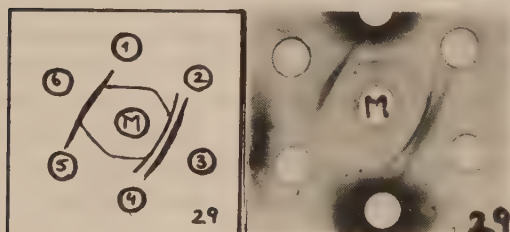


Abb. 29

Speziesspezifität im OUCHTERLONY-Test

M : Anti-Human-Leber C-GOT

1 u. 4: Ratte-Leber Gesamtextrakt

2 u. 5: Ratte-Leber C-GOT

3 u. 6: Human-Leber C-GOT

Eine Zusammenfassung der Identitätsverhältnisse ist in Tab. 7 gegeben. (Dazu folgende Zeichenerklärung: $\emptyset$: keine Präzipitation, $\times$: serologisch nicht identisch und $\hookleftarrow$: serologisch partialidentisch.)

Tab. 7

Identität der korrespondierenden Isoenzyme bei Fremdspezies.

	Rind	Schwein	Ratte
Anti-Human M-GOT mit Herz	$\emptyset$	$\emptyset$	$\hookleftarrow$
Anti-Human M-GOT mit Leber	$\hookleftarrow$	$\emptyset$	$\emptyset$
Anti-Human C-GOT mit Herz	$\emptyset$	$\hookleftarrow$	$\hookleftarrow$
Anti-Human C-GOT mit Leber	$\hookleftarrow$	$\hookleftarrow$	$\hookleftarrow$

6) Antikörpertiter und Hemmwirkung

Der nach der MANCINI-Technik bestimmte Titer der präzipitierenden und die im Photometer Eppendorf ermittelte Wirkung der hemmenden Antikörper der Seren zeigten für die zeitlich unterschiedlichen Abnahmetage etwa gleichen Verlauf, d. h. daß ein hoher bzw niedriger Präzipitationstiter einhergeht mit einer hohen bzw niedrigen Hemmwirkung des Serums (s. Tab. 8 und Skizzen 14 bis 16).

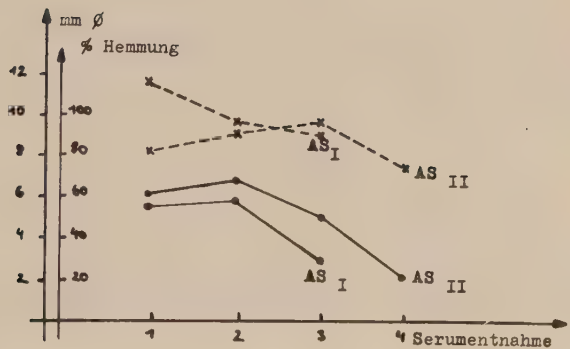
Tab. 8

Antikörpertiter und Hemmwirkung

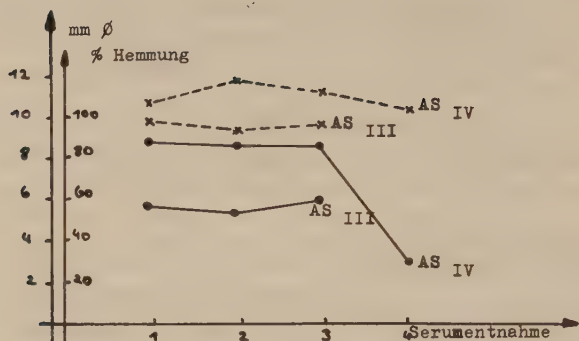
	AS I				AS II			
	1	2	3	4	1	2	3	4
mm $\emptyset$ MANCINI	11,5	9,0	8,4	$\%$	8,0	8,8	8,6	6,9
% Hemmung	54	56	31	$\%$	56	62	43	19

	AS III				AS V			
	1	2	3	4	1	2	3	4
mm $\varnothing$ MANCINI	9,4	8,5	9,1		10,2	11,0	10,5	10
% Hemmung	53	50	95		88	83	78	27

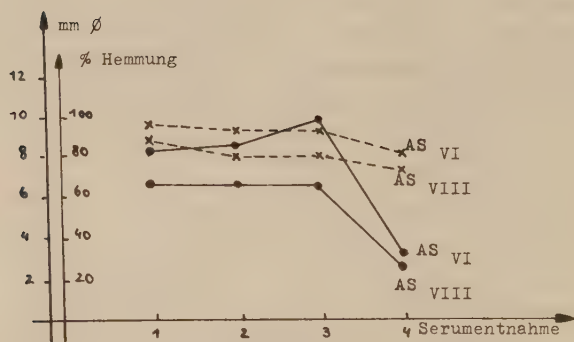
	AS VI				AS VIII			
	1	2	3	4	1	2	3	4
mm $\varnothing$ MANCINI	9,4	8,8	8,5	7,4	8,5	8,2	8,0	7,4
% Hemmung	83	80	89	39	64	64	64	31



Skizze 14 Antikörper-Titer im Ringtest nach MANCINI (x---x) und Hemmung der Seren im Photometer Eppendorf (•—•).



Skizze 15 Antikörper-Titer im Ringtest nach MANCINI (x--x) und Hemmung der Seren im Photometer Eppendorf (●—●).



Skizze 16 Antikörper-Titer im Ringtest nach MANCINI (x--x) und Hemmung der Seren im Photometer Eppendorf (●—●).

D Diskussion

Zur Immunisierung wurden Kaninchen verwendet, Versuchstiere, die schon zahlreichen anderen Autoren (1, 4, 5, 9, 16, 18, 22) zur Immunisierung mit den verschiedenen Antigenen dienten.

Die Erst- und die Boosterinjektionen erfolgten unter Zugabe von Freund'schem Adjuvans stets intraperitoneal, Mc CARTY (6) hatte bei intravenöser Immunisierung von Kaninchen mit Desoxyribonuclease aus Rinder-Pankreas weder präzipitierende noch hemmende Antikörper erhalten; eine intraperitoneale Injektion hingegen wurde mit der Bildung präzipitierender Antikörper beantwortet.

Der Immunisierungsreiz der intraperitonealen Transaminaseninjektionen wurde von den einzelnen Versuchstieren hinsichtlich der Schnelligkeit der Bildung und der Menge von präzipitierenden und hemmenden Antikörpern unterschiedlich beantwortet:

- a) ein erstes Auftreten von Antikörpern wurde frühestens 20 Tage nach Erstinjektion (Tiere 1, 2, 5, 6, 7, 8), spätestens nach 30 Tagen (Tiere 3 und 4) festgestellt;
- b) die im MANCINI-Test halb quantitativ ermittelten Titer der präzipitierenden Antikörper zeigten für Tiere, die mit gleichem Antigen unter gleichen Bedingungen immunisiert worden waren, unterschiedliche Werte;
- c) die Enzymaktivitätshemmung schwankte im Vergleich aller Tiere untereinander zwischen 25 % u. 94 %, im Vergleich zweier gleichartig immunisierter Tiere maximal zwischen 25 % und 50 %.

Bei gleichen Immunisierungsbedingungen könnten Konstitution und Immunitätslage der einzelnen Versuchstiere die bestimmenden Faktoren für Schnelligkeit der Bildung, Menge und Zusammensetzung der Antikörper sein.

In der Immunelektrophorese wurden die Human-Transaminasen von den korrespondierenden Antikörpern stets nur in einer einzigen Linie präzipitiert.

Andere Ergebnisse zeigte die Präzipitation im OUCHTERLONY-Test: in nahezu allen Fällen entstanden zwei Linien, wobei eine Identifizierung beider Linien als Enzymlinien nicht erzielt werden konnte.

Das könnte zu der ersten Annahme führen, daß die Zahl der Präzipitationslinien bedingt ist durch die unterschiedlichen Mengenverhältnisse des Antigens (0,0025 ml) gegenüber einer relativ großen Antikörpermenge (0,2 ml) in der Immunelektrophorese, im Vergleich zu gleichen Volumina Antigen u. Antikörper (0,05 ml) im OUCHTERLONY-Test.

Auch die Zeit der Diffusion, die für die Immunelektrophorese 1 bis 2 Tage, für den OUCHTERLONY-Test durchschnittlich 7 Tage betrug, könnte für die Zahl der Linien von Bedeutung sein.

Beide Annahmen jedoch würden das Vorliegen eines nicht-homogenen Antikörpers fordern.

B. CINADER (7) nimmt an, daß bei Immunisierung mit Enzymen während einer langen Immunisierungsdauer Antikörper gebildet werden, die gegen verschiedene Molekülgruppen ein und desselben Antigens gerichtet sind: so sollen die zuerst gebildeten Antikörper gegen Molekülgruppen fern dem aktiven Zentrum des Enzyms gerichtet sein, während die nach sehr langer Immunisierungsdauer entstandenen Antikörper gegen Molekülgruppen nahe dem aktiven Zentrum oder gegen dieses selbst gerichtet sind.

Die in unseren Versuchen verwendeten Antisera stellten Misch-Sera, gewonnen durch Zusammenschütten von Seren verschiedener Abnahmetage, dar.

OUCHTERLONY (33) erklärte sich Erscheinen und Formation des spezifischen Musters eines Präzipitationsspektrums durch den Diffusionsprozess wandernder, kritischer Konzentrationen von Antigen und Antikörper. Präzipitatlinien werden dort geformt, wo solche kritischen Konzentrationen aufeinandertreffen. Dabei seien Präzipitate semipermeabel für die Diffusion einer dritten Komponente, die nicht in der individuellen Antigen-Antikörperreaktion eingeschlossen ist.

Ferner zeigte OUCHTERLONY, daß ein nach Immunisierung mit einem bestimmten Antigen gewonnenes Antiserum ein Spektrum von mehreren Präzipitationslinien ergeben kann. Somit ließen sich die im OUCHTERLONY-Test entstandenen Doppellinien wie folgt erklären: die nach langer Immunisierungsdauer gewonnenen Antisera enthielten ein gegen verschiedene Molekülgruppen des Enzyms gerichtetes Antikörper-Spektrum. Diese verschiedenen Antikörper-Komponenten werden während des etwa 7 tägigen Diffusionsprozesses im OUCHTERLONY-Test getrennt und führen zu getrennt liegenden Präzipitationslinien mit einem einzigen Antigen.

Demgegenüber war die 1 bis 2 tägige Diffusionszeit in der Immunelektrophorese zu kurz, um den einzelnen Antikörper-Komponenten eine Auftrennung und Bildung mehrerer Präzipitationslinien zu ermöglichen.

Untersuchungen zur Enzymspezifität zeigten, daß die Antikörper isoenzymspezifisch waren: d. h. M-GOT-Antisera präzipitierten nur die M-GOT, nie die C-GOT; umgekehrt C-GOT-Antisera.

D. SCHNEIDER untersuchte in parallel vorgenommenen Enzymaktivitätshemmtesten im Photometer Eppendorf die hemmenden Eigenschaften derselben Antiseren: er fand nie Kreuzreaktionen; auch die hemmenden Antikörper zeigten Isoenzymspezifität.

G. NACE (28) fand bei Untersuchungen über die Verteilung von Frosch-Lactat-Dehydrogenase in den verschiedenen Geweben, daß die gegen Frosch-LDH-Isoenzyme gebildeten Antikörper isoenzymspezifisch waren.

Deutliche Kreuzreaktionen hingegen und somit keine Isoenzymspezifität zeigten Antikörper gegen fünf Isoenzyme von Rinder-LDH (23).

KUBOWITZ und OLT erhielten 1943 ein Antiserum vom Hahn, das die LDH von Ratten-Muskel und vom Jensen-Sarkom der Ratte in gleicher Weise hemmte.

Im Gegensatz zur Enzymspezifität wurde eine Organspezifität der Transaminasen-Antikörper nicht beobachtet; M-GOT-Antikörper präzipitierten die korrespondierenden Enzyme sowohl von Herz als auch von Leber. C-GOT-Antikörper zeigten gleichsinniges Verhalten.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Autoren; obwohl BOYER (3) bei der Stärke-Gel-Elektrophorese von unspezifischer alkalischer Phosphatase aus Humanorganen eine beträchtliche Heterogenität fand, zeigten die Antikörper keine Organspezifität.

Mc GEACHIN und J. REYNOLDS (9) untersuchten Amylase aus Schweine-Leber, Schweine-Serum und Schweine-Zunge mit spezifischem Antiserum; obwohl sich dabei Unterschiede zwischen der Amylase aus den verschiedenen Organen ergaben, zeigten die Antikörper keine Organspezifität.

Mit den korrespondierenden Isoenzymen der Fremdspezies Rind, Schwein und Ratte wurde die Speziesspezifität der Antikörper untersucht.

Dabei ergab sich, daß die gegen Human-Transaminasen gebildeten Antikörper zum Teil mit den Isoenzymen der Fremdspezies kreuzreagierten, zum Teil jedoch nicht, so daß man von einer eingeschränkten Speziesspezifität sprechen könnte.

Keine Präzipitation durch die entsprechenden Antisera zeigten Rinder-Herz M-GOT und C-GOT, Schweine-Herz M-GOT und Schweine-Leber M-GOT.

Präzipitation unter Spornbildung und somit Partialidentität des Isoenzyms für Fremd- und Humanspezies wurde beobachtet bei Rinder-Leber M-GOT und C-GOT, Schweine-Herz C-GOT, Schweine-Leber C-GOT, Ratte-Herz M-GOT und C-GOT und Ratte-Leber C-GOT.

OUCHTERLONY (33) zeichnete an Hand zahlreicher Antigen-Antikörperreaktionen in Gel einige Reaktionen zur Identifizierung von Antigenen auf:

1. Völlig und harmonisch ineinanderübergehende Präzipitationslinien werden von serologisch identischen Antigenen gebildet.
2. Serologisch nicht identische Antigene zeigen sich überkreuzende Linien.
3. Eine Präzipitation unter Spornbildung spricht für serologisch verwandte Antigene und damit für eine Partialidentität.

Speziesspezifität beschrieben G. KREBS und A. NAJJAR (18) für Antikörper gegen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Bäckerhefe und M. POLLOCK (34) für Antipenicillase.

E Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Transaminasen-Isoenzyme M-GOT bzw C-GOT aus Human-Herz und Human-Leber führen bei Kaninchen zur Bildung von hemmenden und präzipitierenden Antikörpern, die frühestens in dem am 20. Tag, spätestens in dem am 30. Tag nach der Erstinjektion abgenommenen Kaninchenserum nachgewiesen wurden.
2. Die präzipitierenden Eigenschaften der Antikörper wurden mit der Immunelektrophorese, dem OUCHTERLONY-Test und dem Ringtest nach MANCINI untersucht. In der Immunelektrophorese präzipitierten die Antikörper ihre korrespondierenden Antigene in einer einzigen, mit Amidoschwarz anfärbbaren Linie. Im OUCHTERLONY-Test bewirkten alle Enzyme außer der Leber M-GOT bei einem Teil der Antiseren zwei Präzipitationslinien, wobei eine Identifikation der enzymespezifischen Linie nicht erzielt werden konnte.
3. Die Antikörper waren isoenzymspezifisch, d. h. M-GOT-Antiseren präzipitierten nur die M-GOT, nie die C-GOT; umgekehrt die C-GOT-Antiseren.
4. Organspezifität der Antikörper bestand nicht; M-GOT-Antikörper präzipitierten die korrespondierenden Enzyme von sowohl Herz als auch Leber. C-GOT-Antikörper verhielten sich auch in der Organspezifität gleichsinnig.
5. Mit den korrespondierenden Isoenzymen der Fremdspezies Rind, Schwein und Ratte wurde die Speziesspezifität der Antikörper untersucht.
Keine Präzipitation mit den korrespondierenden Antikörpern gegen Human-Transaminasen zeigten Rinder-Herz M-GOT und C-GOT, Schweine-Herz M-GOT und C-GOT und Ratte-Herz C-GOT.

Fragliche serologische Partialidentität mit den Humanenzymen zeigten Rinder-Leber M-GOT und C-GOT, Schweine-Leber C-GOT, Schweine-Herz C-GOT, Ratten-Herz M-GOT und C-GOT und Ratten-Leber C-GOT.

Eine komplette Identität der Linien wurde in keinem Fall beobachtet.

6. Der Titer der präzipitierenden Antikörper zeitlich verschiedener Serumentnahmen zeigte einen weitgehend parallelen Verlauf zur Menge der hemmenden Antikörper.

E Literaturverzeichnis

- 1) Adams, H. M.:
The Reaktion between the Enzyme Tyrosinase and its
Specific Antibody
J. exp. Med. (1942), 76, 175
- 2) Arnon, R. and G. E. Perlmann:
Antibodies to Pepsinogen and Pepsinogen Modifications
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103, 744
- 3) Boyer, S. H.:
Human Organ Alkaline Phosphatases: Discrimination by
Several Means including Starch Gel Electrophoresis
of Antienzyme-Enzyme Supernatant Fluids
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 938
- 4) Bussard, A. E.:
Reaction Kinetics of the Four-Component System: Glu-
cose-6-Phosphate Dehydrogenase, Substrate, Coenzyme
and Antibody Behaviour of Serum from Tolerant Rabbits
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 890
- 5) Mc Carty, M.:
The Inhibition of Streptococcal Desoxyribonuclease
by Rabbit and Human Antisera
J. exp. Med. (1949), 90, 543
- 6) Mc Carty, M.:
Purification and Properties of Desoxyribonuclease
Isolated from Beef Pankreas
J. gen. Physiol. (1946), 29, 123
- 7) Cinader, B.:
Immunochemistry of Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II 495

- 8) Cinader, B. and K. J. Lafferty:
Antibody as Inhibitor of Ribonuclease: The Role of
Steric Hindrance, Aggregate Formation and Specificity
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 653
- 9) Mc Geachin, R. L. and J. M. Reynolds:
Differences in Mammalian Amylases Demonstrated by
Enzyme Inhibition with Specific Antisera
J. biol. Chem. (1959), 234, 1456
- 10) Mc Geachin, R. L.:
Immunochemical Characterization of Amylase Isozymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1009
- 11) Grabar, P.:
Immunelectrophoretic Analysis
Meth. biochem. Anal. (1959), 7, 1
- 12) Halbert, S. P.:
Naturally Occuring Human Antibodies to Streptococcal Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1027
- 13) Harshman, S., J. P. Robinson and V. A. Najjar:
The Mechanism of Antibody-Antigen-Interaction and
the Theory of Subcomplementarity between the Reactive
Sites of Antibody and Antigen
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 688
- 14) Mc Ivor, B. C. and H. D. Moon:
J. Immunol. (1959), 82, 328, zit. b. 12
- 15) Kaplan, N. O. and S. White:
Immunological Characteristics of Dehydrogenases
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 835

- 16) Kirk, J. S. and J. B. Sumner:
Antiurease, J. biol. Chem. (1931/32), 94, 21
- 17) Koshland, D. E., Jr.:
Properties of the Active Site of Enzymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 630
- 18) Krebs, E. G. and V. A. Najjar:
The Inhibition of d-Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase by Specific Antiserum
J. exp. Med. (1948), 88, 569
- 19) Lang, N.:
Ein Verfahren zum Nachweis von Reaktionen vom Typ
der Antigen-Antikörper-Bildung
Klin. Wo. Schr. (1955), 33, 29
- 20) Lang, N. und S. Massarrat:
Antikörper gegen transaminasen
Verh. Dtsch. Ges. Physiol. Chem., 15. Mosbacher
Kolloquium: Immunchemie, Mosbach 1964
- 21) Lang, N. und S. Massarrat:
Versuche zur immunologischen Enzymbestimmung mit
Transaminasen-Antikörpern
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. (1962), 68, 275
- 22) Leiers, H. und F. Albrecht:
Fermentforschung (1926), 8, 52, zit. b. 59
- 23) Markert, C. L. and E. Appella:
Immunochemical Properties of Lactate Dehydrogenase
Isozymes
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 915
- 24) Marks, P. A. and E. A. Tsutsui:
Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Studies on
the Relation between Antigenicity and Catalytic

Activity - the Role of TPN

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 902

25) Masserrat, S. und N. Lang:

Organspezifität von Antikörpern gegen Herzmuskel-
Transaminasen

Transact. 7th Internat. Congr. Intern. Med. (1962 I)
508

26) Maurer, P. H.:

Nature of Antigenic Determinants in Proteins and
Synthetic Polypeptides

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 549

27) Milgrom, F. and S. Dubiski:

Antigenity of Antibodies of the Same Spezies
Nature, (1957), 179, 1351

28) Nace, G. W.:

Tissue Lokalization of Multiple Forms of Enzymes

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 980

29) Nisselbaum, J. S., M. Schlamowitz and O. Bodansky:

Immunochemical Studies of Functionally Similar En-
zymes Ann. N. Y. Acad. Sci. (1961), 94, 970

30) Nisselbaum, J. S. and O. Bodansky:

Immunochemical Studies of Human Lactic Dehydrogenases

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 930

31) Ouchterlony, Ö.:

Antigen-Antibody Reactions in Gels

Acta path. microbiol. scand. (1949), 26, 507

32) Ouchterlony, Ö.:

Antigen-Antibody Reactions in Gels

Arkiv Kemi (1949), 26 B, Nr. 14

- 33) Ouchterlony, Ö.:
Antigen-Antibody Reactions in Gels
Acta path. microbiol. scand. (1953), 32, 231
- 34) Pollock, M. R.:
Penicillinase-Antipenicillinase
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 988
- 35) Schwick, G.:
Technik der Immuno-Elektrophorese
Lab.-Bl. (1958), 8. Jahrgang, 1, 11
- 36) Siekevitz, P.:
Reactions of Ribosomal-Bound Enzyme with its Anti-
body: An Exercise
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 773
- 37) Suskind, S. R., M. L. Wickham and M. Carsiotis:
Antienzymes in Immunogenetic Studies
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1107
- 38) Ultmann, J. E. and P. Feigelson:
The Interaction between Xanthine Oxidase and its
Antibody
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 724
- 39) Uriel, J.:
Characterization of Enzymes in Spezific Immune-
Precipitates
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 956
- 40) Williams, C. A., jr. and P. Grabar:
Immunelectrophoretic Studies on Serum Proteins
J. Immunol. (1955), 74, 158
- 41) Wust, C. J.:
Interference with Antibody Neutralization by Coen-

zyme and Reducing Agents

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 849

42) Yanofsky, C.:

Antibodies to the Two Protein Components of
Escherichia Coli Tryptophan Synthetase

Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 103 II, 1067

Lebenslauf

Am 20. Juli 1939 wurde ich als drittes Kind des Schreiners Werner Penther und seiner Ehefrau Anna, geb. Janotte, in Posen geboren. Zusammen mit drei Brüdern wuchs ich in Kirchplatz, dem Wohnsitz meiner Eltern, auf, bis wir im Februar 1945 infolge des unglückseligen Krieges unsere Heimat verlassen mußten. Eine erste Zuflucht fanden wir in Mecklenburg. Von dort siedelten wir im September 1946 nach Maar in Hessen um, wo ich im Herbst desselben Jahres in die Volksschule eintrat. Nach bestandener Aufnahmeprüfung besuchte ich seit Ostern 1951 das Gymnasium in Lauterbach, das ich Ostern 1960 mit bestandener Reifeprüfung verließ. Im Oktober 1951 erfolgte der Umzug unserer Familie nach Lauterbach in Hessen.

Im Mai 1960 begann ich in Marburg mein Hochschulstudium mit den Fächern Sport, Englisch und Geographie. Im September 1960 erfolgte ein Wechsel des Studienfachs zur Medizin. Das vorklinische Studium absolvierte ich in Marburg. Nach einem Semester in Wien kehrte ich an die Universität in Marburg zurück, wo ich im September 1966 das Medizinische Staatsexamen ablegte.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Beckmann, Behrend, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Bücher, Brück, Cleve, Deicher, Dimroth, Dölle, Drawert, Du Mesnil, Ehrhard, Exner, Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hartwig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrand, Jakob, Knauff, Lang, Linneweh, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Neubauer, Niessing, Oksche, Petry, Rohen, Salfeld, Sauer, Schiff, Schleger, Schmid, Schmidt, Schürmann, Schwaiger, Seidel, Siegert, Straub, Streicher, Walcher, Würterle

in Wien : Asperger, Benda, Fuchsig, Jesserer, Rauscher, Tappeiner

